

VU Research Portal

Tumor (phospho)proteomic and genomic profiling to guide selection of targeted therapy in patients with cancer

Labots, M.

2018

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Labots, M. (2018). *Tumor (phospho)proteomic and genomic profiling to guide selection of targeted therapy in patients with cancer*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

SAMENVATTING

Achtergrond

Doelgerichte therapie tegen kanker

Kanker is een groep van ziekten die gekenmerkt wordt door onbegrensde groei en verspreiding van afwijkende lichaamscellen. Deze tumorcellen hebben via meerdere evolutionaire stappen hun kenmerkende groeibevorderende eigenschappen verkregen. In het algemeen kan gesteld worden dat kanker te genezen is, mits de tumor op tijd ontdekt en in zijn geheel verwijderd wordt, en zonder dat er bij een operatie (dan nog ondetecteerbare) tumorcellen achterblijven of toch uitgezaaid zijn.

De vooruitzichten van patiënten met uitgezaaide kanker zijn sinds de jaren '60 van de vorige eeuw sterk toegenomen. Zo heeft klassieke *chemotherapie* in belangrijke mate bijgedragen aan het verlengen en verbeteren van de kwaliteit van leven van patiënten met diverse vormen van kanker. Bij uitgezaaide zaadbalkanker zorgt chemotherapie zelfs voor de genezing van de meerderheid van de patiënten. Desondanks is voor veel vormen van uitgezaaide kanker een overleving korter dan 2 jaar de realiteit.

Door toegenomen kennis van de tumorbiologie is het therapeutisch arsenaal in de afgelopen 15 jaar uitgebreid met tientallen zogenoemde *targeted therapies*, geneesmiddelen die (meer) doelgericht aangrijpen op groeibevorderende moleculaire eigenschappen van een tumorcel. Vaak gaat het hierbij om tyrosinekinases die zich aan het oppervlak van een tumorcel bevinden, danwel in een tumorcel deel uitmaken van een signaleringsroute of – keten. Deze tyrosinekinases dragen bij sommige patiënten overmatig bij aan het in gang zetten en houden van een signaleringsroute die de celdeling stimuleert, en daarmee de processen van tumorgroei en uitzaaiing. *Doelgerichte geneesmiddelen* kunnen de overdracht van deze groeibevorderende signalen blokkeren, door ofwel buiten de cel te voorkomen dat groeifactoren de receptor tyrosinekinases aan het oppervlak kunnen binden en activeren (dit betreft de *monoclonale antistoffen*), danwel door binnen de tumorcel aan deze signaleringsmoleculen te binden (dit betreft de *kinaseremmers*). Anders dan aanvankelijk gedacht

gaan ook deze specifieke geneesmiddelen gepaard met soms onvoorspelbare bijwerkingen. Deze middelen hebben er echter voor gezorgd dat patiënten met bijvoorbeeld uitgezaaid(e) borst-, nier- en longkanker en melanoom tot jaren langer leven dan voorheen.

Personalized medicine

De keuze voor een medicamenteuze antitumorbehandeling wordt gemaakt op basis van het tumortype, dat – ook ingeval van uitzaaiingen naar organen elders - genoemd wordt naar het orgaan waarin de tumor is ontstaan. Als voor een bepaalde vorm kanker bijvoorbeeld voor een (combinatie van) geneesmiddel(en) aangetoond is dat dit een kans op baat geeft van 60-70 procent, dan zal deze behandeling op basis hiervan bij elke patiënt met deze ziekte worden overwogen, ongeacht de specifieke eigenschappen van diens tumor. *Personalized medicine* bij kanker betreft een op de individuele patiënt afgestemde therapie, waarbij de keuze voor een behandeling wordt gebaseerd op de aan- en soms afwezigheid van specifieke moleculaire kenmerken van de tumor (*biomarkers*), zoals een verandering in een gen (*mutatie*) of een overmatig aanwezig eiwit. De achterliggende gedachte bij personalized medicine is dat door deze benadering de kans op respons verhoogd, de progressievrije of totale overleving verlengd, en/of de kwaliteit van leven verbeterd wordt ten opzichte van een niet-geïndividualiseerde behandeling. Door de toegenomen kennis over kanker, verbeterde diagnostische mogelijkheden en door het beschikbaar komen van steeds meer doelgerichte medicijnen kan 1] het aantal behandelingsmogelijkheden per ziektebeeld worden uitgebreid, 2] de kans op bijwerkingen van therapie die niet effectief blijkt te zijn, worden verkleind, 3] steeds vaker vooraf worden bepaald of een behandeling kans van slagen heeft en 4] het aantal patiënten dat kan deelnemen aan een studie waarvoor de aanwezigheid van een bepaalde biomarker vereist is, toenemen.

DNA – en eiwitbiomarkers

Veel van de biomarkers die kunnen voorspellen of een doelgerichte behandeling zal aanslaan, zijn gebaseerd op *DNA-afwijkingen* van de tumor. Een verandering in een gen (*mutatie*) kan aanleiding

geven tot een eiwit met een veranderde of versterkte functie, hetgeen de tumorcel een groeivoordeel geeft. Ook een 'versterkt' aanwezig gen, waarvan er niet 2, maar bijvoorbeeld 50 kopieën aanwezig zijn (*amplificatie*), kan hetzelfde groeibevorderende effect hebben. Een dergelijke mutatie of amplificatie is te beschouwen als 'achilleshiel' van de tumor en kan daarmee als aangrijpingspunt (*target*) voor therapie dienen. Echter, doordat genomisch onderzoek in een tumor bij lang niet alle patiënten een duidelijk therapeutisch target oplevert, doordat de betekenis van sommige mutaties voor de uiteindelijke functie van een tumorcel niet altijd duidelijk is, of doordat er geen geneesmiddel beschikbaar is dat op het gevonden target aangrijpt, maakt DNA-onderzoek van de tumor zeker niet voor alle patiënten een behandeling met doelgerichte geneesmiddelen mogelijk. In de afgelopen jaren is in het kankeronderzoek naar *personalized* of *precision* medicine de aandacht wat verlegd van het identificeren van afzonderlijke, op genen gebaseerde biomarkers, naar een ruimere analyse van de tumorbiologie. Hierbij wordt behalve naar afwijkingen op DNA-niveau ook naar *eiwitpatronen* gezocht die kunnen voorspellen of een respons op therapie zal optreden, of die kunnen suggereren welke (tyrosine)kinaseremmers voorgeschreven zouden moeten worden om de eerder vastgestelde hyperactieve signaleringsroutes in tumorcellen te blokkeren.

Fosfo-proteomics voor de analyse van signaaltransductie in een tumor

Celgroei en celdood zijn biologische processen die nodig zijn voor het in stand houden van gezonde weefsels. Deze processen worden in gezonde cellen gereguleerd door eiwitten die fungeren als 'seinpостen' binnen sterk verweven communicatie- of signaleringsroutes. Bij kanker zijn deze ontspoord. Dit wordt met name veroorzaakt door sterk toegenomen activiteit van bepaalde enzymen, *kinases*, die als aanjagers van deze signaleringsroutes fungeren. Deze overactieve kinases kunnen de activiteit van andere eiwitten beïnvloeden en stimuleren door hier een chemische (fosfaat)groep aan te binden (*fosforylering*). De signaleringsroutes waarlangs de tumorgroei wordt aangejaagd en die ook ongevoeligheid (*resistentie*) tegen antikankermiddelen kunnen verklaren, zijn te vergelijken met een complex bedradingsnetwerk. Dit vraagt derhalve om een aanvullende *tumor profiling* strategie voor het ontdekken van kenmerken die als aangrijpingspunt voor nieuwe therapie

kunnen dienen of die de respons op al bestaande therapie beter kunnen voorspellen.

Massaspectrometrie is het meest geschikte instrument om een goed beeld te krijgen van de aanwezigheid van gefosforyleerde kinases en daarmee van de complexe signaalpaden in een tumor. Hiermee kan van een bloed- of tumormonster (*biopsie*) een weefselbrede analyse van eiwitexpressie (*proteomics*) en fosforylering (*fosfoproteomics*) verricht worden, waarbij de verschillende eiwitfragmenten op basis van hun massa worden gescheiden. Doordat deze eiwitfragmenten na hun identificatie in de massaspectrometer weer herleid kunnen worden tot het oorspronkelijke eiwit, kan een profiel van de actieve eiwitten in het tumorbiopt verkregen worden.

Analyse van (fosfo)eiwit- en genomische tumorprofielen als leidraad voor selectie van doelgerichte geneesmiddelen bij patiënten met kanker

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek richt zich op een aantal methoden van *tumor profiling* om de verschillende aspecten van de tumorbiologie in kaart te brengen, met als doel de selectie van doelgerichte geneesmiddelen voor individuele patiënten met gevorderde kanker te verbeteren. Het merendeel van de in dit proefschrift beschreven technieken is gebaseerd op het verkrijgen van (fosfo)eiwit- en kinaseprofielen bij individuele patiënten. Twee hoofdstukken zijn gebaseerd op genomische analyses bij patiënten met maag- en darmkanker.

Hoofdstuk 2 bevat een review van de beschikbare literatuur over het voorspellen van de uitkomst van (targeted) therapie aan de hand van met massaspectrometrie verkregen peptideprofielen in serum en plasma van patiënten met gevorderde kanker. Lang werd dit 'serumpeptidoom' al als mogelijk waardevolle bron voor het aantonen of opvolgen van kankeractiviteit beschouwd. Bij het kritisch beschouwen van 38 studies concludeerden wij dat de meerderheid van deze studies niet zodanig was opgezet dat de resultaten gebruikt zouden kunnen worden voor het nemen van behandelbeslissingen in de dagelijkse praktijk. Dit was veelal een gevolg van de bescheiden aantallen patiënten per studie (mediaan 59), sterk wisselende opzet en gebruik van dito uitkomstmaten

alsmede het ontbreken van een poging tot validatie van de bevindingen in een onafhankelijke patiëntengroep. Wij verrichtten een gepoolde analyse van 9 studies naar de voorspellende eigenschappen van een 8-peptidenprofiel, een onder de naam Veristrat® commercieel verkrijgbare serum- en plasmatest, die zou kunnen voorspellen of de prognose van patiënten met uitgezaaide longkanker ‘goed’ of ‘slecht’ zou zijn. De test werd bepaald bij ruim 1000 patiënten voorafgaand aan start met de EGFR-tyrosinekinaseremmer erlotinib of gefitinib. Uit onze analyse volgde dat de prognose van patiënten met een ‘slechte’ testclassificatie voorafgaand aan deze behandeling inderdaad zeer matig was; de mediane progressievrije overleving (PFS) bedroeg 2.0 maanden en de totale overleving (OS) 4.6 maanden. Dit is dusdanig kort dat deze test, bij deze groep patiënten, de klinische besluitvorming voor deze behandeling inderdaad zou kunnen beïnvloeden, namelijk door bij hen af te zien van het starten van deze therapie. In plaats daarvan zouden specifiek deze patiënten met een voorspelde slechte prognose (mogelijk) beter behandeld kunnen worden met chemotherapie, aangezien hiermee de PFS bijna tweemaal zo lang bleek te zijn, namelijk 3.94 versus 1.87 maanden, $p = 0.002$. Voor patiënten met een ‘goede’ testclassificatie werd een dergelijk onderscheid tussen de 2 behandelingsvormen niet gevonden. Samenvattend ondersteunen deze bevindingen de idee dat het massaspectrometrie-gebaseerde profilen van serumpeptiden gebruikt zou kunnen worden voor het maken van een therapiekeuze bij patiënten met gevorderde longkanker. Toekomstige studies zouden zodanig moeten worden opgezet dat de vertaalslag naar de klinische praktijk gemakkelijker gemaakt kan worden.

Hoofdstuk 3 is gewijd aan verschillende manieren om de in de tumor aanwezige kinases met behulp van chemische proteomics en eiwitmicroarrays in kaart te brengen, waarbij met name de (toekomstige) implementeerbaarheid van deze technieken in de klinische praktijk voor het selecteren van een behandeling met kinaseremmers besproken wordt.

In **Hoofdstuk 4** worden de optimale testomstandigheden voor en de prestaties van de PamChip® tyrosinekinase peptidesubstraat-microarray onderzocht. Deze chip bestaat uit een poreus plaatje van

aluminiumoxide waarop 144 verschillende peptidesubstraten geplaatst zijn die door de in een tumorlysaat aanwezige tyrosinekinases gefosforyleerd en geactiveerd kunnen worden. Fosforylering van een peptide op de chip door een in het tumorlysaat aanwezig kinase veroorzaakt, via een antiphosphotyrosine-antilichaam, een fluorescerend signaal dat met een camera gedetecteerd kan worden. Door zowel een controlesample als een sample waaraan een kinaseremmer is toegevoegd te onderzoeken, biedt deze chip ook de mogelijkheid om, *in vitro*, het effect van een of meerdere kinaseremmers te testen. Op deze manier kan voor een individuele patiënt afgeleid worden welke kinases waarschijnlijk in de tumor actief zijn en mogelijk een voorspelling gedaan worden over de kans op baat van deze patiënt bij een behandeling met (tyrosine)kinaseremmers. Wij concludeerden dat de tyrosinekinase-activiteitsprofielen van controlesamples en die van recombinant kinases zeer reproduceerbaar en in een kort tijdsbestek te meten waren. Dit zijn cruciale eigenschappen voor toekomstig gebruik in de klinische praktijk. Tegelijkertijd zagen we bij het gebruik van kinaseremmers in de test veelvuldig remming van dezelfde hyperactief aanwezige kinasesubstraten, waarbij de vraag rijst of deze peptides specifiek genoeg zijn voor de mogelijke toepassing van deze chip als therapieselectie-instrument. Wij concludeerden dat het repertoire aan peptiden op de microarray mogelijk geoptimaliseerd zou kunnen worden met behulp van massaspectrometrie-gebaseerde fosfoproteomics.

Hoofdstuk 5 beschrijft de resultaten van een pilotstudie naar therapieselectie van proteinkinaseremmers (PKIs) bij patiënten met gemetastaseerde solide tumoren zonder standaardbehandelingsmogelijkheden. Patiënten werd gevraagd om een tumorbipt af te laten nemen. Dit bipt werd gebruikt voor het met de in het vorig hoofdstuk besproken microarray maken van fosforyleringsinhibitieprofielen van 6 verschillende kinaseremmers: sunitinib, sorafenib, erlotinib, dasatinib, everolimus en lapatinib. Op basis van het aantal geremde substraten en de mate van fosforyleringsinhibitie werd, per patiënt, de sterkste remmer *in vitro* vastgesteld. Deze werd vervolgens voorgeschreven. Voor deze studie waren 43 patiënten beoogd om het doel van deze studie te evalueren, namelijk om met deze selectiestrategie de kans op 'clinical benefit' (stabiele

ziekte of een respons) na 12 weken behandeling in deze fase 1-patientpopulatie te verhogen van 10% naar 25%.

Voor alle patiënten konden goede bipten en kinase(remmings)profielen worden verkregen. Na analyse van de eerste 11 behandelde patienten bleek dasatinib bij 8 patiënten de sterkste remmer in vitro, zonder dat dit vervolgens bij behandeling resulteerde in stabiele ziekte (SD) of een (partiele) respons (PR). Bij 2 van de 11 patiënten werd sunitinib geselecteerd: één had SD gedurende meer dan 4 maanden als beste respons en bij één was er sprake van SD na 6, maar progressieve ziekte (PD) na 12 weken. Bij alle overige patiënten was er sprake van PD na 6 weken behandeling. Omdat wij hierna berekenden dat de kans < 1% zou zijn dat de vooraf bepaalde eisen voor voortgang van de studie gehaald zouden worden, en omdat wij zagen dat er onvoldoende sprake was van daadwerkelijke selectie van therapie, werd geconcludeerd dat de huidige opzet niet toereikend was voor het bereiken van het gestelde doel. De studie werd voortijdig onderbroken. Wij suggereerden dat de in deze in vitro assay gebruikte concentraties van kinaseremmers heroverwogen en mogelijk gebaseerd zouden moeten worden op basis van de tumorconcentraties van deze middelen in patiënten.

Vanaf **Hoofdstuk 6** wordt de aandacht in het proefschrift verlegd naar massaspectrometrie-gebaseerde fosfo-proteomics. In dit hoofdstuk worden de effectiviteit van twee commercieel verkrijgbare antifosfotyrosineantilichamen (P-Tyr-1000 en 4G10) beoordeeld op hun vermogen om in lysaat van de darmkankercellijn HCT116 zoveel en zo reproduceerbaar mogelijk tyrosinegefosforyleerde fosfopeptiden te identificeren. Dit betreft (geactiveerde) peptiden waarbij het door kinases overgebrachte fosfaatmolecuul gebonden is aan een tyrosine-aminozuur van het peptide. Wij vonden dat met P-Tyr-1000, vergeleken met 4G10, de meeste fosfopeptiden per sample geïdentificeerd werden en dat deze data beter reproduceerbaar waren. Dit antilichaam werd vervolgens nader onderzocht in een glioomcellijn U87 met en zonder EGFR-mutatie voor het bestuderen van de effecten van de EGFR-tyrosinekinaseremmer erlotinib op de signaaloverdracht. De vastgestelde (hyper)fosforylatie van andere kinases zoals MET en PTK2 in de gemuteerde cellijn

toont de potentie van tyrosine(pTyr)-fosfoproteomics voor het verkrijgen van inzicht in resistentiemechanismen bij mono-targeted therapie.

In **Hoofdstuk 7** wordt de stap naar klinische toepassing van tyrosine(pTyr)-fosfoproteomics gemaakt.

Deze methode is ontwikkeld voor het profileren van grotere (tumor)samples, zoals een resectiepreparaat, waarbij per sample 10-20 mg eiwit gebruikt wordt. Deze relatief grote hoeveelheid is exemplarisch voor de naald-in-hooiberg-zoektocht naar tyrosinegefosforyleerde fosfopeptiden, aangezien deze slechts 1% van het gehele fosfoproteoom uitmaken. Echter, voor het met pTyr-fosfoproteomics voorspellen van respons op kinaseremmers bij patiënten met een gemetastaseerde maligniteit zou deze techniek toepasbaar moeten zijn op veel kleinere samples, zoals naaldbiopten. Wij hebben hiertoe eerst de benodigde eiwitinput voor het immunoactiviteitsprotocol verlaagd naar 1 mg per sample, waarbij gebruik werd gemaakt van lysaat van de darmkankercellijn HCT116. Ondanks de sterk verlaagde eiwitinput bleef de fosfopeptide-identificatie en –kwantificatie reproduceerbaar. Door het meemeten van samples met hogere (10 mg) eiwitinput kon de identificatie van fosfopeptiden in de lage inputsamples verbeterd worden. Deze benadering hebben wij daarna getest op tumorweefsel verkregen van 7 patiënten met een primair coloncarcinoom. Per patiënt werden 2-4 14G naaldbiopten genomen van het kort daarvoor uitgenomen resectiepreparaat. Met pTyr-fosfoproteomics konden per 1 mg sample meer dan 200 fosfopeptiden, herleidbaar tot diverse kinases, geïdentificeerd worden. Daarnaast bleken de 2-4 samples van individuele patiënten samen te clusteren, hetgeen aangeeft dat het met deze techniek mogelijk is *patientspecifieke* fosfo-eiwitprofielen te onderscheiden. Deze bevindingen geven de haalbaarheid van pTyr-fosfoproteomics op bioptniveau weer en ondersteunen de verdere ontwikkeling van deze techniek voor personalized medicine.

Hoofdstuk 8 bevat een pilotstudie waarin pTyr-fosfoproteomicsprofiling werd verricht in naaldbiopten van patiënten met gevorderde solide tumoren. Gezien de bevindingen van Hoofdstuk 5 en het gebrek aan data hierover, was het doel van deze studie de tumorconcentratie van 6

proteïnekinaseremmers (PKI) te bepalen en om na te gaan of er (geneesmiddelspecifieke) meetbare effecten van deze remmers op het tyrosine-fosfoproteoom zouden zijn. Hiertoe werden tumorbipten genomen voor en na 2 weken behandeling met een PKI. Er werd niet geselecteerd op tumortype. Voor elk van de kinaseremmers erlotinib, sorafenib, dasatinib, sunitinib, everolimus en vemurafenib werd gestreefd naar 5 evalueerbare patiënten. Deze studiemedicatie betrof ofwel geregistreerde medicatie voor het specifieke tumortype van een patiënt, danwel werd gedurende 2 weken off-label, als niet-geregistreerde medicatie gegeven voorafgaand aan start van de daadwerkelijke standaard (chemo)therapie. Meer dan 40 patiënten gaven toestemming voor dit onderzoek. Gezien het studieontwerp bevestigt dit de bereidheid van patiënten voor deelname aan onderzoek, waarbij zij in dit geval bipten en, voor $\pm 40\%$ van de patiënten, een kortdurende behandeling ondergingen die uitsluitend een onderzoeksdoel dienden.

Bij 90% van de 31 patiënten bij wie ook het tumorbipt na 2 weken therapie kon worden afgenomen, kon de tumorconcentratie van het betreffende PKI bepaald worden. Deze varieerden tussen 2-10 μM voor de 5 eerstgenoemde cohorten, terwijl dit meer dan 1 mM was voor vemurafenib. De tumorconcentraties waren beduidend hoger dan in plasma, en zeer veel hoger dan de concentratie die nodig is voor het remmen van de (veronderstelde) geneesmiddelspecifieke aangrijpingspunten, de target kinases. Dit suggereert dat de biologische activiteit van deze middelen mede het gevolg is van remming van andere kinases waarvoor deze PKIs een lagere affiniteit hebben. Hierbij rijst overigens de vraag of het monitoren van adequate bloedspiegels tijdens therapie (therapeutic drug monitoring) de kans op baat of duur van respons gunstig kan beïnvloeden.

Bij 84% van de patiënten die met de studiebehandeling startten, kon de fosfoproteomicsanalyse worden uitgevoerd, waarbij de mediane eiwitinvoer 1.6 mg per biopsiesample betrof. Net als in Hoofdstuk 7 bleken de tumorbipten van individuele patienten te clusteren, maar deze clustering van de voor- en tijdens-behandelingsbipten geeft ook aan dat de door de PKI veroorzaakte veranderingen in het fosfoproteoom kleiner waren dan de profielverschillen tussen patienten. Ondanks de ogenschijnlijke overeenkomsten tussen het voor- en tijdens-behandelingsample van

een individuele patient, bleken bij het vergelijken van deze biopten tien- tot honderdtallen fosfopeptiden met een factor > 5 versterkt, of juist verminderd gereguleerd te zijn. Bij het clusteren van de fosfopeptiden die een dergelijk sterke mate van up- of downregulatie vertoonden bij tenminste 3 van de 5 patienten per cohort, bleken deze peptiden de voor- en na-behandelingssamples te kunnen onderscheiden. Bij het vervolgens toepassen van een veel minder stringente fosfopeptideselectie bleek er slechts een marginale overlap tussen de cohorten te bestaan. Dit geeft aan dat deze \pm 40-70 up- en 4-130 downgereguleerde peptiden *specifiek* het gevolg zijn van een bepaalde kinaseremmer. Deze bevinding is van belang voor het kunnen voorspellen of evalueren van de activiteit van een kinaseremmer in een patient. Tot slot werd een aantal fosfopeptiden gevonden die naarmate de tumorconcentraties in een cohort hoger waren, een lagere intensiteit in de na- versus voor-behandelingssamples vertoonden. Voor erlotinib waren dit ondermeer peptides die gerelateerd waren aan het target kinase EGFR, maar ook aan PTK2, STAT3 en PRKCD.

Deze studie vormt de eerste klinische fosfoproteomicsanalyse op grotere schaal van tumorbiopten verkregen voor- en na behandeling. De uitvoerbaarheid van deze vorm van tumorprofiling in een klinische studie en daarmee de potentie voor het personalized medicine-onderzoek werd hiermee ook aangetoond.

Voor **Hoofdstuk 9 en 10** werd een andere vorm van tumor profiling toegepast, namelijk op DNA-niveau, om bekende en potentiële drug targets voor de behandeling van maag- en darmkanker te identificeren. Genomische veranderingen kunnen als mogelijke targets voor therapie dienen als deze verstoringen in eiwitten, signaleringsroutes of beide geven, die specifiek door een geneesmiddel onderbroken kan worden. Zo kunnen bijvoorbeeld amplificaties van oncogenen zoals HER2 aanleiding geven tot overexpressie van onco-eiwitten, die als aangrijpingspunt dienen voor doelgerichte geneesmiddelen.

Hoofdstuk 9 beschrijft het voorkomen van veranderingen in het aantal DNA-kopieën bij patiënten met maagkanker. De slechte vooruitzichten voor patiënten met gemetastaseerd maagcarcinoom

vragen om verbeterde behandelingsmogelijkheden, hetzij door de identificatie van meer targets en ontwikkeling van meer targeted therapies, danwel door het 'herontdekken' en gebruiken van reeds bestaande (antikanker)geneesmiddelen. Maagtumoren zijn vaak chromosomaal instabiel, hetgeen leidt tot toename of juist verlies van delen van een chromosoom (gains en losses). Deze veranderingen in het aantal DNA-kopieën kunnen het gedrag van een tumor en daarmee de prognose van een patiënt beïnvloeden. Met array CGH (array Comparative Genomic Hybridization) kunnen patronen van DNA-kopieveranderingen bestudeerd worden. Deze techniek is gebruikt om bij 183 primaire maagtumoren na te gaan of er drug targets, zowel bekende als mogelijk nieuwe, gelegen waren op de chromosomale regio's die een sterke verrijking of 'gain' vertoonden. Dertig genen die eerder al als 'drug target gen' aangemerkt waren, waren versterkt aanwezig bij tenminste 2% van de tumoren. Dit betrof genen waarvan het eiwitproduct als aangrijpingspunt van sommige chemotherapeutica dient, alsook sommige primaire targets van een aantal geregistreerde targeted therapies. Daarnaast was een aantal genen met een duidelijke 'gain' te herleiden tot al bestaande geneesmiddelen, zoals een antihistaminicum en eens statine, die nader als potentieel antikankermiddel zouden kunnen worden onderzocht.

In **Hoofdstuk 10** wordt de relatie tussen (profielen van) veranderingen in DNA kopie-aantallen en progressie-vrije overleving bij 349 patiënten met gemetastaseerd coloncarcinoom beschreven. Deze patiënten werden met eerstelijns palliatieve chemotherapie behandeld in de fase 3-studies CAIRO en CAIRO2. Daarnaast wordt op dezelfde manier als in Hoofdstuk 9 het voorkomen van bekende en mogelijk nieuwe drug-target genen in deze patiëntengroep beschreven. Er werden duidelijke 'gains' gevonden in genen waarvan het eiwitproduct een aangrijpingspunt van geregistreerde targeted therapies vormt, zoals FGFR1. Dit gen toonde een sterke toename in het aantal kopieën ('high-level gain') bij 3.7% van de patiënten en is daarmee een interessante kandidaat voor therapieselectie. FGFR1 is namelijk een target van regorafenib, de enige (tyrosine)kinaseremmer die geregistreerd is voor patiënten met gemetastaseerd coloncarcinoom, waarvan echter - in een niet op (deze) biomarker geselecteerde populatie - slechts een beperkte overlevingswinst is aangetoond.

Voor TOP1 en VEGFA, target genen van irinotecan en bevacizumab respectievelijk, kon de relatie met uitkomst van systemische therapie worden onderzocht, zij het in zeer kleine subgroepen van 3 verschillende chemotherapieschema's. Van een duidelijke associatie tussen een 'high-level gain' en progressievrije overleving als maat voor baat bij therapie was echter geen sprake.

Concluderende overwegingen

Tot dusver zijn er diverse klinische studies verricht waarbij tumorprofilering op vers-ingevroren naaldbiopten wordt gebruikt voor het selecteren van targeted therapie bij patiënten met gevorderde kanker die de beschikbare standaardbehandelingen voor hun ziekte hebben doorlopen. Voor deze studies zijn met name genomische analyses gebruikt, zoals het 'sequencen' van het complete genoom, array CGH en gerichte mutatie-analyse. De haalbaarheid voor de dagelijkse praktijk van het 'vers' biopteren en analyseren van dergelijke tumorprofielen binnen een redelijke termijn is inmiddels gevoeglijk aangetoond. De baat die patiënten vervolgens bij deze benadering hebben lijkt tot dusver beperkt te zijn.

Dit zou kunnen betekenen dat DNA-gebaseerde *tumor profiling* niet de enige manier is om verbeterde selectie van targeted therapie voor patiënten met gevorderde kanker te bereiken. Op basis van het vermogen om afwijkende signaleringsprocessen te detecteren en dit te koppelen aan celfunctie, voorzien wij, mede gezien de toenemende beschikbaarheid van proteïnekinaseremmers, dat massaspectrometrie-gebaseerde *fosfoproteomics* voor dit doel een aan *genomics* complementaire benadering zou kunnen zijn. Dit vraagt ten eerste studies waarbij de haalbaar- en toepasbaarheid van fosfoproteomics in deze patiëntenpopulatie wordt getoond. Daarnaast is het noodzakelijk over een geïntegreerde DNA-eiwit data-analysemethode te beschikken waaruit algoritmes volgen die, voor een individuele patiënt, kunnen bepalen op welke kinases of signaalpaden de behandelpijlen gericht moeten worden.

Op basis van onze en eerdere translationele studies concluderen wij dat interventiestudies waarbij

gebruik gemaakt wordt van tumorweefsel en bloed belangrijk zijn voor het verbeteren van selectiemethoden voor targeted therapie en die de dagelijkse klinische praktijk zouden kunnen veranderen. De bereidwilligheid van patiënten om aan dergelijke studies toestemming te verlenen is belangrijk en verdient grote waardering.

Een specifieke bevinding van dit proefschrift is dat tumorconcentraties van proteïnekinaseremmers meer inzicht kunnen geven in het werkingsmechanisme van deze middelen en dat met deze data rekening gehouden moet worden bij het ontwikkelen van nieuwe therapieselectiemethoden.

Daarnaast dragen de bevindingen van dit proefschrift bij aan de ontwikkeling van pTyr-fosfoproteomics voor selectie van tyrosinekinaseremmers bij patiënten met gevorderde tumoren. Zo werd aangetoond dat deze techniek toepasbaar is op naaldbiopsniveau, waarbij een eiwitinput gebruikt kan worden die vergelijkbaar is met 5-10% van het oorspronkelijke protocol. De studie beschreven in Hoofdstuk 8 vormt de eerste grootschalige klinische fosfoproteomicsstudie van tumorbiopsen verkregen voor- en tijdens behandeling. De bevinding dat behandeling met verschillende van deze middelen resulteert in een geneesmiddelspecifiek fosfoproteomicsprofiel toont de potentie van deze techniek om, samen met genomische biomarkers, de personalized medicine-beloofte in deze patiëntenpopulatie te realiseren.